

Trabajo práctico de Laboratorio

Construcción de un biosensor de Cu⁺²

(Evaluación de la sensibilidad y especificidad del Promotor CusC de *E. Coli*)

Existen microorganismos que utilizan metales pesados como nutrientes o aceptores finales de la cadena transportadora de electrones, provocando así la disminución de la toxicidad de los mismos o su acumulación en vesículas específicas. Estos microorganismos poseen un alto valor biotecnológico por su utilización en la biorremediación de ambientes. Pero también poseen información de alto valor biotecnológico, dado que los genes implicados en estas maquinarias de detoxificación (usualmente organizados en operones) pueden ser utilizados para generar herramientas tecnológicas, como por ejemplo biosensores de metales pesados. Estos metales (siendo los más conocidos: Cu, Cd, Zn, As), son reconocidos por proteínas que al incorporarlos, sufren una transformación estructural que actúa como activador o represor de la inducción de los promotores específicos de las rutas de degradación o reducción de la toxicidad de ellos.

Un ejemplo de lo antes mencionado, es el promotor CusC, sensible a Cu⁺² a través de la vía CusS/CusR de *E. Coli* (Gudipaty, *et al.* 2012). La misma consiste en la enzima transmembrana histidin-kinasa CusS, la cual se ancla a la membrana citoplasmática de la bacteria, y el regulador citoplásmico CusR. Cuando CusS une a las moléculas de Cu⁺² solubles en el periplasma, transfiere un grupo fosfato del ATP al aspartato 51 de CusR mediante la histidina de la posición 271 de CusS. Ahora la forma fosforilada de CusR es capaz de unir a las “cajas” de repeticiones invertidas de CusR (AAAATGACAANNTTGTCATTTT) y activar así la expresión *downstream*.

En *E. Coli* estas “cajas” están presentes entre los promotores del operón CusCFBA, el cual codifica para una bomba multiproteica que exporta el Cu⁺² presente en el citoplasma y del periplasma al exterior de la célula, y los promotores del operón CusRS, el cual codifica el sistema de dos componentes antes mencionado (actuando como una señal de *feedback* positivo) (**Figura I**)

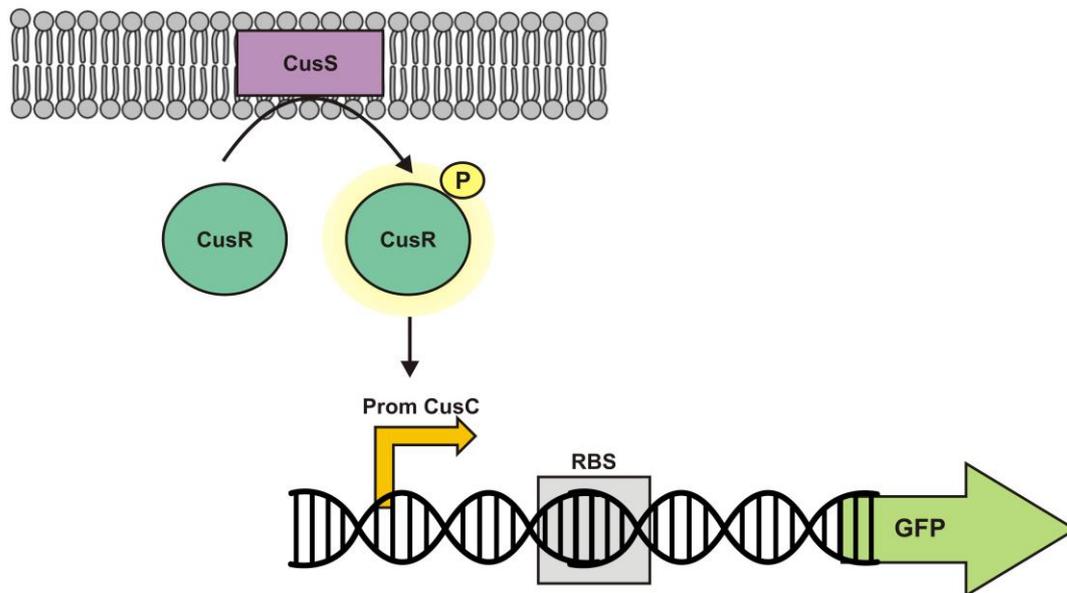


Figura I. Esquema de señalización del sistema CusS/CusR.

El esquema básico de un biosensor microbiológico consiste en la utilización de un promotor inducible por la molécula que se desea detectar y un gen reportero *downstream* al mismo. Este último puede ser una enzima, una proteína fluorescente o el primer eslabón de una cascada de señales que finaliza en un efecto medible, entre otros.

Dado que el promotor CusC es sensible a moléculas de Cu^{+2} activando la transcripción de los genes *downstream* al mismo, es posible utilizar esta secuencia como parte de un biosensor de Cu^{+2} , acoplado a una proteína reportera para la medición de la señal, como por ejemplo la proteína fluorescente verde (GFP)

Hipótesis de trabajo

La existencia del promotor CusC *upstream* al gen reportero GFP permite sentir la presencia de Cu^{+2} en el medio extracelular, a partir de la emisión de fluorescencia.

Objetivo general

Generar una construcción plasmídica tal que al ser transformada en *E. Coli* pueda ser utilizada como biosensor de Cu^{+2} , a partir de la expresión de GFP.

Metodología

En este esquema de trabajo utilizaremos la proteína fluorescente verde (GFP) derivada de medusa *Aequorea victoria*¹, *downstream* al promotor CusC inducible por Cu⁺², en el esqueleto del vector de expresión pET-28a

Tal como se menciona previamente los promotores inducibles por metales pesados son elementos presentes en los operones de detoxificación de los mismos, y en algunos casos estos son altamente específicos mientras que en otros casos suelen ser promiscuos. Por este motivo, además de construir el biosensor, evaluaremos la especificidad y la sensibilidad del sistema.

Esquema de trabajo

-Construcción del biosensor

- 1) Realizar una *Miniprep* del vector pET-GFP, el cual contiene el gen reportero GFP bajo el promotor T7.
- 2) Realizar la síntesis *de novo* del promotor CusC a partir de los oligonucleótidos Cu-Fw-BglIII y Rv-Cu-XbaI.

Secuencia del promotor CusC (98 nt):

gcgggatcagatggcaatcgcttattggcaaaatgacaattttgtcatttttctgtcaccggaaaatcag
agcctggcgagtaaagttggcggcataa

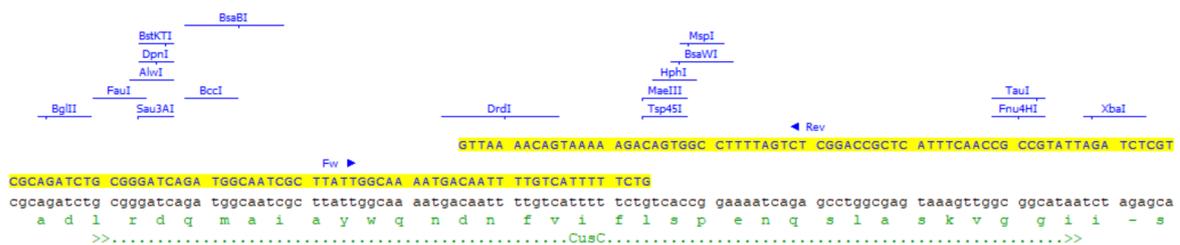


Figura II. Esquema del promotor CusC y los *primers* Fw-BglIII y Rv-Cu-XbaI.

¹ El 8 de octubre de 2008 los profesores Martin Chalfie, Osamu Shimomura y Roger Y. Tsien fueron galardonados por la Real Academia Sueca de Ciencias de Estocolmo con el Premio Nobel de Química 2008 "por su descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde (GFP)", herramienta indispensable para la biología y la medicina modernas.

- 3) Realizar la digestión del fragmento sintetizado y del vector pET-GFP con las enzimas BglIII y XbaI.
- 4) Ligar el promotor CusC al vector pET-GFP (previamente procesado por *CleanUp*)
- 5) Transformar la ligación en bacterias *E. Coli* electrocompetentes (Top 10)
- 6) Realizar un *screening* de las colonias obtenidas mediante *Colony PCR*
- 7) Ensayar sensibilidad y especificidad del biosensor obtenido, en placa y en cultivo.

-Evaluación de la sensibilidad y especificidad del sistema

Evaluar la fluorescencia emitida por GFP en cultivos de *E. Coli* conteniendo el vector que codifica para el biosensor en presencia de concentraciones variables de CuSO₄ (0-10 mM). Y también en curvas de concentración de ZnSO₄ y NiSO₄.

Bibliografía

Susana Campuzano "Presente y futuro de los biosensores microbianos electroquímicos" Real sociedad española de química. An. Quím. 2011, 107(4), 350–357.

Verma N1, Singh M. "Biosensors for heavy metals". *Biometals*. 2005 Apr;18(2):121-9.

Enterina JR1, Wu L1, Campbell RE2. "Emerging fluorescent protein technologies". *Curr Opin Chem Biol*. 2015 Aug;27:10-7. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.05.001. Epub 2015 May 29.

Yamamoto K1, Ishihama A. **Transcriptional response of Escherichia coli to external copper.** "Transcriptional response of Escherichia coli to external copper." *Mol Microbiol*. 2005 Apr;56(1):215-27.

Gudipaty, Swapna Aravind et al. "**Regulation of Cu(I)/Ag(I) Efflux Genes in Escherichia Coli by the Sensor Kinase CusS.**" *Fems Microbiology Letters* 330.1 (2012): 30–37. PMC. Web. 14 Sept. 2017.

Gudipaty, Swapna A., and Megan M. McEvoy. "**The Histidine Kinase CusS Senses Silver Ions through Direct Binding by Its Sensor Domain.**" *Biochimica et biophysica acta* 1844.9 (2014): 1656–1661. PMC. Web. 14 Sept. 2017.

Affandi, Trisiani, Aaron V. Issaian, and Megan M. McEvoy. "**The Structure of the Periplasmic Sensor Domain of the Histidine Kinase CusS Shows Unusual Metal Ion Coordination at the Dimeric Interface.**" *Biochemistry* 55.37 (2016): 5296–5306. PMC. Web. 14 Sept. 2017.